

# El interactoma de la quinasa GRK2 y sus implicaciones fisiopatológicas

FEDERICO MAYOR MENÉNDEZ

## RESUMEN

Las quinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) representan un importante punto de convergencia de diferentes rutas de señalización. Las GRKs participan, junto con las arrestinas, en la regulación de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), una familia de centenares de proteínas de membrana de gran importancia fisiológica y farmacológica, y pueden también desempeñar un papel en la propagación de señal, contribuyendo a ensamblar complejos multimoleculares en el entorno del receptor, actuando como proteínas adaptadoras («scaffold») gracias a su interacción con diversas proteínas implicadas en señalización celular. Además, las GRKs (y en particular la ubicua isoforma GRK2), pueden también fosforilar ciertos receptores tirosina-quinasa y un número creciente de sustratos no-GPCRs, sugiriendo que estas proteínas podrían tener diversas funciones efectoras. Otras interacciones funcionales descritas están implicadas en la regulación de la expresión, degradación, localización y actividad de las GRKs. Dado que los niveles y/o funcionalidad de GRK2 están alterados en diversas e importantes situaciones patológicas, como fallo cardíaco congestivo, inflamación o ciertos tumores, el mejor conocimiento de las redes de interacciones de esta proteína («interactoma») permitirá desvelar la contribución de GRK2 a procesos celulares básicos, y entender cómo sus alteraciones en condiciones patológicas pueden participar en el desencadenamiento o desarrollo de diversas enfermedades cardiovasculares inflamatorias o neoplásicas, así como evaluar su potencial como diana diagnóstica y/o terapéutica.

## SUMMARY

G protein-coupled receptor kinases (GRKs) represent an important point of convergence of different signalling routes. GRKs participate together with arrestins in the regulation of multiple G protein-coupled receptors (GPCR), a family of hundreds of membrane proteins of key physiological and pharmacological importance. Thanks to their ability to interact with a variety of proteins involved in cell signaling, GRKs (and in particular the ubiquitous GRK2 isoform) can also play a role in signal propagation by helping assemble macromolecular signalosomes in the receptor environment thus acting as agonist-regulated adaptor scaffolds. Moreover, GRK2 can also phosphorylate certain tyrosine kinase receptors and a growing number of non-GPCR substrates, thus suggesting that these proteins could have diverse «effector» functions. Other functional interactions have been shown to be involved in the regulation of GRK2 expression levels, degradation, localization, and activity. Since GRK2 levels/functionality are altered in a variety of important pathological conditions, such as heart failure, inflammation or certain tumours, a better knowledge of the GRK2 protein interaction network (interactome) would help to unveil the contribution of GRK2 to basic cellular processes, to understand how its alteration in pathological conditions may participate in the triggering or development of several cardiovascular, neoplastic or inflammatory diseases and to evaluate its potential use as a diagnostic and/or therapeutic target.

## INTRODUCCIÓN

GRK2 es un miembro ubicuo de la familia de las quinasas de receptores acoplados a proteínas G, un grupo de siete serina/treonina quinasas que específicamente reconocen y fosforilizan receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) activados, conduciendo a la desensibilización del receptor (1,2). Como se resumirá a continuación, nuevas evidencias indican que, además de una importante función reguladora de GPCR, GRK2 parece desempeñar un papel central e integrador en muchas cascadas de transducción de señal. La complejidad de esta red de interacciones funcionales («interactoma») de GRK2 predice que alteraciones en sus niveles y/o actividad, como las presentadas en diversas patologías cardiovasculares, inflamatorias o neoplásicas relevantes, pueden tener efectos importantes en la señalización celular. En este capítulo se discutirá cómo un mejor conocimiento del interactoma de GRK2 y de sus consecuencias funcionales puede ayudar a comprender mejor los mecanismos y señales que deter-

minan sus niveles de expresión y actividad y sus alteraciones durante la evolución de varias enfermedades, así como evaluar el efecto de dichas alteraciones en la compleja red de las funciones celulares y fisiológicas de GRK2.

## CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LA FAMILIA GRK

Las GRKs constituyen un grupo de proteínas S/T quinasas (siete miembros en los mamíferos) que específicamente reconocen y fosforilizan GPCRs activados por agonistas y comparten una arquitectura de dominios funcionales similar (2-4). Los miembros de la familia GRK pueden ser subdivididos en tres grupos principales basados en homología de secuencias: la familia ropsodina quinasa o GRK visuales (GRK1 y GRK7), la subfamilia de la quinasa del receptor  $\beta$ -adrenérgico (GRK2/GRK3), y la subfamilia GRK4 (GRK4, GRK5 y GRK6). GRK2, 3, 5 y 6 están expresadas ubicuamente en los tejidos de los mamíferos.

Las GRKs comparten una arquitectura estructural común (ver Figura 1), con un dominio catalítico central bien conservado (~270 aa), similar al de otras serina-treonina quinasas, flanqueado por un dominio N-terminal (~185 aa) y un dominio carboxilo-terminal de longitud variable (~105-230 aa). Se ha sugerido que el dominio N-terminal es importante para el reconocimiento del receptor y el anclaje a la membrana. Esta región contiene también un dominio RH (Regulator of G protein signalling homology domain) de ~120 aa. En el caso de las GRK2 y GRK3, se ha demostrado que el dominio RH interactúa específicamente con miembros de la familia  $G\alpha_q$ , bloqueando de este modo su interacción con su efector, la fosfolifasa C beta. La región C-terminal de GRK2 contiene un 'pleckstrin homology domain' (PH) que permite su unión a fosfolípidos tipo PIP2 y a subunidades  $G\beta\gamma$  libres, y que está por tanto implicado en su translocación dependiente de agonista a la membrana plasmática (2,4).

La estructura cristalina de GRK2 en complejo con subunidades  $\beta_1\gamma_2$  de proteínas G proporcionó nuevos elementos para comprender la regulación de las GRKs, situando sus tres regiones diferenciadas (dominios RH, quinasa y PH) en los vértices de un triángulo, en un excelente ejemplo de cómo múltiples dominios modulares se integran en una única molécula para transducir y regular vías de señalización (5). La estructura del dominio quinasa de GRK2 es parecida a la presentada por otras quinasas. Curiosamente, el dominio RH puede interactuar con los dominios quinasa y PH, sugiriendo una importante función en la regulación de la actividad de la quinasa. En el complejo, las características de la interfase de los dominios RH-PH indican que puede existir una regulación alostérica entre estas dos regiones. Por tanto, cambios en la conforma-

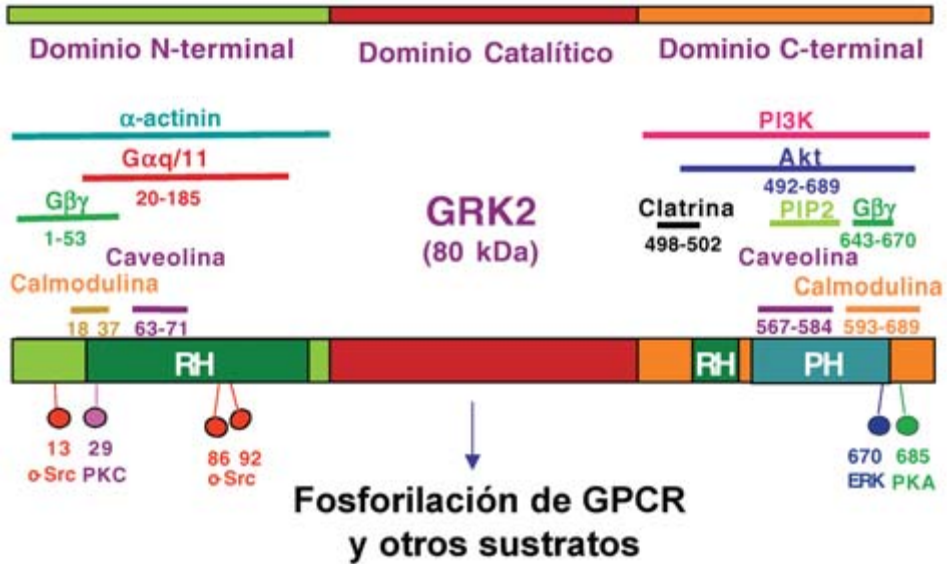


FIGURA 1. Representación esquemática de los dominios funcionales de GRK2. La quinasa muestra tres dominios bien diferenciados: el catalítico, con homología a otras serinaltreonina quinasa; una zona de homología con proteínas RGS (RH, del inglés RGS-Homology domain); y una región C-terminal que incluye un dominio de homología a plecstrina (PH) y otro de asociación a subunidades Gβγ de las proteínas G. Se muestran también las regiones implicadas en la interacción con diversas proteínas celulares identificadas hasta el momento, y los residuos fosforilados por distintas proteína-quinasa. Ver texto para más detalles.

ción de los dominios RH o PH provocados por interacciones proteína-proteína o por fosforilación podrían llevar a cambios en la actividad catalítica vía su interfaz con el dominio quinasa. Además de esta arquitectura general, las investigaciones en curso que se discuten más adelante están dando a conocer la localización de regiones implicadas en la interacción con distintas proteínas celulares y de puntos de fosforilación reguladora en la estructura de GRK2 (Figura 1 y referencias 2 y 4).

## FUNCIÓN CARACTERÍSTICA DE GRK2: REGULACIÓN DE GPCR

La fosforilación mediada por GRKs es uno de los mecanismos bien caracterizados para la desensibilización de los GPCR. Concretamente, se ha mostrado que GRK2 fosforila una gran variedad de GPCR ocupados por agonistas, incluyendo receptores α y β-adrenérgicos, de angiotensina, endotelina,

prostaglandina, esfingosina-1-fosfato o de quimioquinas, entre otros. La fosforilación del receptor mediada por GRK2 provoca la unión de proteínas citosólicas denominadas arrestinas, que bloquean la capacidad de los GPCR de interactuar con proteínas G, conduciendo a una rápida desensibilización. Como resultado de la unión de  $\beta$ -arrestinas, los receptores fosforilados son el objeto de endocitosis mediada por clatrina, un proceso que finalmente re-sensibiliza y recicla los receptores a la membrana plasmática, y que puede además ayudar a potenciar la activación de caminos de señalización adicionales, en los que las arrestinas y/o GRKs actúan como adaptadores («scaffolds») regulados por agonistas (ver referencias 2, 6 y 7). En este aspecto, se ha mostrado que las  $\beta$ -arrestinas pueden reclutar diferentes moléculas señalizadoras, como c-Src, JNK-3, componentes de la cascada Raf/MEK/ERK, la fosfodiesterasa PDE4, el regulador del citoesqueleto Ral-GDS, componentes de la vía de señalización NF $\kappa$ B o la ubiquitina ligasa Mdm2, entre otros, al complejo del receptor (revisado en 8,9). Por lo tanto, el reclutamiento de arrestinas mediado por GRK es fundamental para provocar la modulación de importantes cascadas de señalización intracelular por GPCR.

## GRK2 TAMBIÉN FOSFORILA SUSTRATOS NO-GPCRS

Es muy interesante destacar que datos recientes muestran que GRK2 puede también interactuar funcionalmente con otros tipos de receptores de membrana, como los receptores de PDGF o EGF con actividad tirosina-quinasa. La fosforilación del receptor PDGF-R por GRK2 reduce la actividad del mismo (10, 11). Por otro lado, la presencia de EGF fomenta la asociación de su receptor con GRK2, seguida por la fosforilación de GRK2 en residuos de tirosina, llevando a la activación de la quinasa y a una mayor «downregulation» de receptores de opiáceos co-expresados (12).

Además, con una activa participación de nuestro laboratorio, están siendo identificados un número creciente de sustratos citoplásmicos de las GRKs, especialmente de GRK2. Entre ellos se encuentran tubulina, sinucleína, fosducina, la proteína ribosomal P2, una subunidad del canal epitelial de sodio, la proteína del citoesqueleto ezrina, la proteína de unión a calcio DREAM, o la p38 MAPK (4). GRK2 también inhibe la parada de crecimiento celular y la apoptosis promovida por TGF en células de hepatoma promoviendo la fosforilación de Smads (13). En términos generales, los datos sugieren que GRK2 puede tener funciones «efectoras» y participar en la regulación de diversos procesos celulares a través de la fosforilación de sustratos funcionalmente muy variados.

## **INTERACCIONES DE GRK2 INDEPENDIENTES DE SU ACTIVIDAD QUINASA**

GRK2 pueden también contribuir, además de a estos procesos dependientes de su actividad catalítica, a modular respuestas celulares de forma independiente de la fosforilación, gracias a su capacidad de interactuar con varias proteínas implicadas en señalización y tráfico celular, como las subunidades  $G\alpha_q$  y  $G\beta\gamma$  de las proteínas G, la enzima PI3K, clatrina, GIT, caveolina, MEK, AKT, y RKIP (revisado en referencias 2-4). Por ejemplo, se ha sugerido que la interacción de GRK2 con PI3K $\gamma$  facilita su reclutamiento a la membrana en respuesta a agonistas adrenérgicos, contribuyendo a la endocitosis y desensibilización del receptor (14). La asociación GRK2/MEK parece ser importante para el control de la inducción por quimioquinas de la activación de MAPK (15). Uniéndose a MEK, GRK2 podría interferir (a nivel global o en localizaciones sub-celulares definidas) con la asociación de MEK a proteínas importantes para su localización celular, internalización o actividad, como los 'scaffolds' MEK-ERK. Por otro lado, dado que las proteínas GIT pueden interactuar con diversas moléculas de señalización implicadas en muchos procesos celulares como dinámica del citoesqueleto, tráfico de membranas o adhesión celular (16), hemos mostrado recientemente que la interacción dinámica GRK2/GIT1 está involucrada críticamente en la modulación de procesos de migración de células epiteliales (17).

## **INTERACCIONES FUNCIONALES REGULATORIAS**

La interacción de GRK2 con otras proteínas celulares parece estar implicada en la regulación de sus niveles de expresión, localización y actividad (2, 7, 9).

### **Modulación de la localización subcelular de GRK2**

GRK2 fue inicialmente caracterizada como una enzima soluble que interactuaba pasajeramente con el lado citosólico de la membrana plasmática tras la activación de GPCR. El control de la actividad de GRK2 y de su reclutamiento a la membrana parece implicar tanto la interacción de dominios N- y C-terminales de la quinasa con diferentes proteínas celulares (como dominios intracitoplasmáticos de GPCR, subunidades  $G\beta\gamma$ , subunidades  $G\alpha_{11}$  y lípidos de la membrana plasmática), como la fosforilación por distintas quinasas, que podrían aumentar (PKA, PKC, Src) o disminuir (MAPK) la unión a

la membrana y/o la actividad catalítica de GRK2 (2, 18, 19). Por otra parte, la distribución subcelular basal de esta quinasa parece ser más compleja, ya que también se ha encontrado en otros compartimentos celulares, sugiriendo que existen múltiples mecanismos que regulan el tráfico entre los diferentes reservorios de esta proteína. Así, cantidades significativas de GRK2 están asociadas específicamente con membranas microsomales a través del dominio N-terminal (20), y GRK2 co-localiza en endosomas con receptores beta2-adrenérgicos internalizados tras la estimulación por agonista (21). En este aspecto, GRK2 puede interactuar directamente con clatrina vía un «clathrin box» presente en la región carboxilo-terminal de GRK2. Además, esta quinasa puede asociarse a proteínas del citoesqueleto como tubulina y  $\alpha$ -actinina, y, como muchas proteínas implicadas en la transducción de señales, GRK2 está también presente en fracciones ricas en caveolina de las membranas celulares (2-4).

### **Regulación de la actividad de GRK2**

La actividad de las GRKs está estrechamente modulada por múltiples mecanismos. Los procesos reguladores incluyen fosforilación por distintas quinasas como c-Src, PKA, PKC o ERK1/2 (revisado en 2) e interacción con varias proteínas. La asociación con  $\alpha$ -actinina, actina, calmodulina, caveolina, el inhibidor de Raf RKIP, o con un componente de la membrana microsomal sin identificar modula negativamente las funciones catalíticas de GRK2. La fosforilación de GRK2 en determinados residuos de tirosina o de serina está cobrando importancia como un mecanismo clave para modular dinámicamente su interacción con otras proteínas celulares. La fosforilación de tirosinas por c-Src parece aumentar la interacción de GRK2 con G $\alpha_q$  (4) y con la proteína adaptadora GIT1 (17). Por otro lado, ERK1/2 fosforila GRK2 en la serina 670, perjudicando fuertemente la interacción GRK2/G $\beta\gamma$  e inhibiendo la translocación de la quinasa y su actividad catalítica, mientras modula también la interacción de GRK2 con GIT1 (2,17).

### **Regulación de la expresión de GRK2**

Se conoce poco acerca de los mecanismos que controlan la transcripción de GRK2. En células de músculo liso de aorta, los agentes que inducen vasoconstricción fisiológica e hipertrofia aumentan de forma notoria la actividad del promotor de GRK2, mientras que las citoquinas pro-inflamatorias promueven el

efecto contrario, sugiriendo que la expresión de GRK2 está fuertemente controlada a nivel transcripcional por la interacción de varias vías de señalización (22). Sin embargo, es necesario determinar si estos mecanismos pueden aplicarse a otros tipos de células.

Por otra parte, nuestro grupo ha mostrado que la regulación de la estabilidad de GRK2 puede proporcionar un importante mecanismo para modular sus niveles de expresión. GRK2 se degrada rápidamente por la vía del proteasoma, y la activación de receptores  $\beta$ 2AR incrementa la ubiquitinación y recambio de la quinasa (2, 23). Nuestro laboratorio ha mostrado también que la unión de arrestina a GPCRs activados promueve la degradación de GRK2 al permitir el reclutamiento de c-Src y la fosforilación de GRK2 en determinados residuos de tirosina (23). La fosforilación por MAPK también promueve la degradación de GRK2 en un proceso también dependiente de la función de  $\beta$ -arrestina (24). Más recientemente, hemos demostrado que Mdm2, una E3-ubiquitina ligasa implicada en el control del crecimiento celular y la apoptosis, desempeña un papel crítico en el recambio de GRK2 (25). La asociación de Mdm2 y GRK2 y la subsiguiente proteólisis es estimulada por la activación de  $\beta$ 2AR y la presencia de  $\beta$ -arrestina. Por el contrario, la activación de la vía de señalización PI3K/Akt por agonistas como IGF-1 altera la degradación de GRK2 mediada por Mdm2, dando lugar a un aumento en la estabilidad y niveles de la quinasa, lo que puede ser relevante en distintos contextos fisiopatológicos, como el cáncer.

## INTERACTOMA DE GRK2 E IMPLICACIONES FISIOPATOLÓGICAS

En resumen, el complejo «interactoma» de GRK2 que hemos resumido hasta ahora propone que esta quinasa puede ser un nodo relevante en las redes de señalización celular (Figura 2). En lo que concierne a la señalización de GPCR, emerge el concepto de que tanto las arrestinas como las GRKs pueden poner fin a ciertas señales mientras desencadenan la propagación de otras al ayudar a congregarse «signalosomas» macromoleculares en el entorno del receptor, actuando como adaptadores o «scaffolds» regulados por agonistas (2, 4, 8, 9). Además de eso, la existencia de otros sustratos no-GPCR y la interacción independiente de fosforilación de GRK2 con diversas proteínas de señalización implicadas en procesos biológicos esenciales sugiere nuevos papeles funcionales para GRK2 que podrían ser relevantes para la fisiología humana y para diversas enfermedades.

Por consiguiente, es tentador sugerir que cambios en la expresión/actividad de GRK2 pueden afectar diferencialmente la funcionalidad de las proteínas con las que interactúa, alterando la homeostasis de maneras distintas, dependiendo



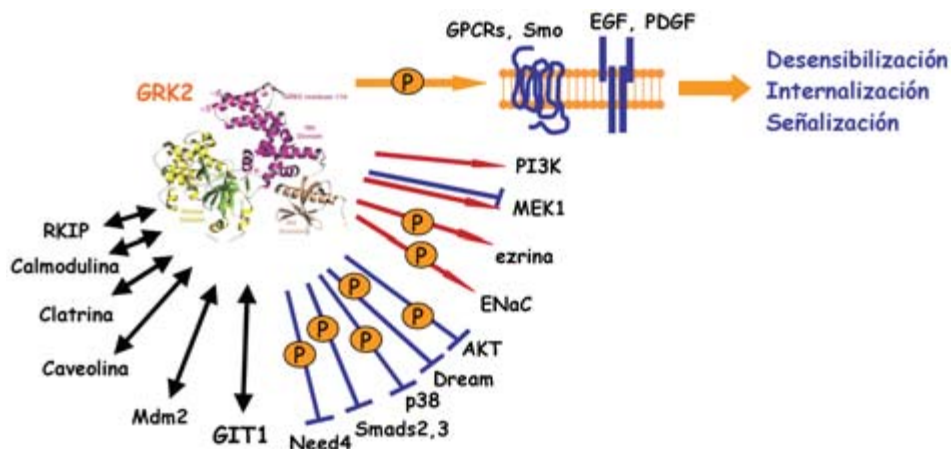


FIGURA 2. Esquema del interactoma global de GRK2. Esta quinasa es capaz de fosforilar una gran variedad de GPCR, así como ciertos receptores de membrana con actividad tirosina quinasa, como los de EGF o PDGF, lo que promueve clásicamente su desensibilización e internalización, pero que también inicia cascadas de señales que contribuyen a configurar la respuesta biológica. Por otra parte, se están identificando múltiples sustratos no-GPCR, cuya fosforilación por GRK2 puede tener efectos positivos o negativos sobre su actividad (como se indica en el esquema), así como otras interacciones de la quinasa con proteínas celulares, independientemente de su actividad catalítica. Se postula que, dependiendo del contexto de señalización y del tipo celular, tendrán lugar preferentemente un subconjunto de estas posibles interacciones, que determinará el efecto de GRK2 sobre las funciones celulares. Ver texto para más detalles.

también del tipo celular del que se trate. Por ejemplo, el hecho de que ratones que carecen de GRK2 mueren entre los días 9 y 14 de desarrollo embrionario (26) apoya la idea de que esta proteína desempeña un papel crítico en la proliferación/diferenciación/migración celular a lo largo del desarrollo. Además, la expresión alterada de GRK2 ha sido asociada a diversas enfermedades humanas y se ha identificado en modelos animales de diferentes patologías. Los niveles de proteína de GRK2 están disminuidos en artritis reumática (RA) en esclerosis múltiple (27) y en modelos de daño isquémico en corazón (3). Por el contrario, la expresión de GRK2 está incrementada en otras situaciones patológicas como fallo cardíaco congestivo e hipertensión (3) y alterada en diversos tumores (28). Estas alteraciones en la expresión de GRK2 pueden directamente causar estas enfermedades o contribuir a su evolución.

A continuación se discuten las alteraciones de GRK2 descritas hasta ahora en determinadas patologías de interés, así como algunas posibles implicaciones fisiopatológicas de ciertas nuevas interacciones de GRK2 con proteínas de señalización celular recientemente descubiertas.

## GRK2 y fallo cardiaco

GRK2 desempeña un papel muy importante en la regulación de la señalización  $\beta$ -adrenérgica en el corazón. La relación entre un incremento en los niveles de proteína de GRK2 y fallo cardiaco congestivo (HF) ha sido establecida en modelos animales y en pacientes con diferentes enfermedades cardiacas. Los niveles del mensajero y actividad de GRK2 están aumentados en pacientes con cardiomiopatías dilatadas, isquémicas o idiopáticas, con isquemia cardiaca o con hipertrofia ventricular izquierda (revisado en referencia 3). Es interesante destacar que, en algunos modelos animales, el desarrollo de fallo cardiaco está precedido por una elevación de los niveles de GRK2, lo que correlaciona con una contractilidad miocárdica y una respuesta  $\beta$ -adrenérgica progresivamente disminuida. Más aún, los niveles de GRK2 están elevados después del infarto sólo en los animales que desarrollarán fallo cardiaco (29). Todo ello subraya la importancia de los niveles de GRK2 como un marcador de la predisposición a la disfunción cardiaca y apoya la idea que GRK2 puede ser una potencial diana terapéutica. Diversos modelos experimentales en ratón parecen aportar esa prueba de concepto. Así, una estrategia exitosa para restablecer la función cardiaca en animales con fallo cardiaco ha sido la inhibición de la actividad de GRK2 mediante la sobreexpresión del fragmento GRK2ct, una construcción que comprende el dominio de unión a subunidades Gbetagamma de GRK2, lo que inhibe la quinasa endógena al evitar su translocación en la membrana. Los animales transgénicos que sobreexpresan GRK2ct también muestran una contractilidad basal y una respuesta a isoproterenol aumentada, lo que sugiere que la actividad de GRK2 modula directamente las respuestas  $\beta$ -adrenérgicas cardiacas *in vivo* (30). Sin embargo, aunque el cruce de estos ratones con otros que mimetizan diferentes tipos de fallo cardiaco puede revertir la disfunción cardiaca, la expresión de GRK2ct no previene otras formas de deterioro del corazón, como las observadas en ratones transgénicos que sobreexpresan  $G\alpha_q$  o dominantes negativos de CREB, a pesar de que se consigue restablecer la señalización  $\beta$ -adrenérgica (revisado en 3). Estos resultados indican que los potenciales beneficios de una terapia génica basada en la expresión de GRK2ct dependerán de la etiología del fallo cardiaco, y sugieren que los efectos de GRK2ct pueden ir más allá de la modulación del módulo de señalización  $\beta$ 1AR/adenilil ciclasa.

Se debería además considerar que los receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, que regulan negativamente la liberación de catecolaminas por la glándula adrenal, también son desensibilizados por GRK2. Puesto que la GRK2 adrenal está también incrementada en fallo cardiaco, esto desencadenaría un pico de catecolaminas, lo cual es *per se* perjudicial para la función cardiaca a largo plazo. Por tanto, los efectos patológicos de GRK2 en fallo cardiaco pueden depender tanto de efec-

tos «locales» sobre la contractilidad cardiaca como de efectos «sistémicos» consecuencia de una excesiva desensibilización de receptores neuro-humorales (31).

Otra cuestión no resuelta es si la expresión elevada de GRK2 es un factor precipitante del fallo cardiaco congestivo o si puede ser considerado un proceso inicial de adaptación en respuesta al «overdrive» adrenérgico, que será patológico a largo plazo. Es interesante apuntar que ratones transgénicos que sobreexpresan GRK2 en corazón no muestran síntomas manifiestos de cardiomiopatía aunque la proteína GRK2 alcance niveles más altos que los detectados en pacientes y en varios modelos animales con fallo cardiaco. De este modo, las terapias desarrolladas para prevenir el incremento de GRK2 en pacientes con enfermedades cardiacas deberían ser aún consideradas con prudencia.

En este contexto, se necesitan modelos experimentales que permitan explorar en detalle las consecuencias funcionales de diferencias en los niveles de GRK2 similares a los alcanzados en pacientes (del orden del doble) en respuesta a estímulos patológicos crónicos o agudos y, además, comparar los resultados con los obtenidos en procesos fisiológicos normales, como el envejecimiento. Los ratones hemizigotos para GRK2, que manifiestan una reducción del 50% en los niveles de esta proteína, surgen como un modelo interesante para relacionar las diferencias encontradas en estos procesos.

A pesar del papel crítico de las GRK2 en el corazón, el conocimiento de los mecanismos que modulan su expresión en células cardiovasculares es limitado. Se ha informado de que la presencia de beta-agonistas incrementa el mRNA de GRK2, mientras que la isquemia podría promover la degradación de GRK2 por el proteasoma en algunos modelos experimentales (revisado en 3). No obstante, hay poca información integrada acerca del efecto general de estímulos fisiopatológicos clave (angiotensina/ catecolaminas/isquemia-reperfusión) en parámetros relacionados, como la expresión de GRK2/ GRK3/ GRK5 (las tres isoformas desempeñan un papel importante en la regulación cardiaca de GPCR), el estatus de fosforilación de GRK2, que puede alterar su actividad, localización y proteínas de interacción, y la expresión de moduladores clave de GRK, como RKIP.

## **GRK2 e hipertensión**

Varias manifestaciones clínicas de hipertensión han sido asociadas a una expresión aumentada de GRK2. Tanto la actividad citosólica de GRK como la expresión de la proteína estaban selectivamente aumentadas en linfocitos de pacientes hipertensos (32, 33). Estos cambios se producían en paralelo a una ineficiente

respuesta beta-adrenérgica, que es esencial para mediar respuestas vasodilatadoras. Dado que GRK2 es un regulador fundamental del sistema beta-adrenérgico, un desequilibrio entre los mecanismos vasoconstrictores y vasodilatadores promovidos por niveles de quinasa alterados podrían conducir a un incremento de la resistencia vascular e hipertensión. Una de las precauciones de este estudio inicial era si los cambios observados en los linfocitos reflejaban los que estaban ocurriendo en la vasculatura. Este hecho se confirmó por los mismos autores en ratas espontáneamente hipertensas y en ratas DAHL hipertensas en respuesta a sal, sugiriendo que GRK2 participa en el desarrollo de la hipertensión de diferentes etiologías (33). La elevada expresión de GRK2 en la vasculatura no es solamente un bio-marcador de hipertensión, sino que participa en su desarrollo. Así, ratones transgénicos que sobreexpresan GRK2 (incluso a niveles modestos) en el músculo liso vascular muestran una respuesta beta-adrenérgica atenuada, sin cambios en la vasoconstricción alfa-adrenérgica, lo que resulta en la elevación de la presión sanguínea y en remodelado vascular (34). Recientemente se ha sugerido que otra vía de señalización importante para el mantenimiento de la tensión portal está alterada a consecuencia de niveles elevados de GRK2 (35). La hipertensión portal promovida por ligadura de los conductos biliares en ratas se acompaña de una disminución de la señalización por el receptor de endotelina ET-1 y de una atenuación de la producción endotelial de NOS, así como por un aumento en la expresión de GRK2. Más aún, ratones hemicigotos para GRK2 muestran mayores niveles de eNOS y una menor hipertensión tras daño hepático que los controles. Este nuevo papel de GRK2 endotelial en la homeostasis vascular podría ser relevante en la hipertensión primaria en humanos, pero no se sabe aún si el aumento de GRK2 detectado en esos pacientes en músculo liso vascular se produce también en el endotelio.

En conjunto, estos estudios sugieren que una mayor expresión vascular de GRK2 puede contribuir de forma importante a la patogénesis y/o al mantenimiento de hipertensión esencial en humanos en presencia de una respuesta vasoconstrictora intacta. Por otra parte, es de destacar que se ha encontrado que GRK2 modula la funcionalidad de canales de sodio epiteliales (ENaC) cuya hiperactividad está directamente relacionada con el desarrollo de hipertensión. Una mayor actividad de GRK2 produce la estabilización de la proteína ENaC y una absorción de sodio aberrante, lo que podría producir un aumento en la presión sanguínea (36).

## **GRK2 y enfermedad de Alzheimer**

A pesar de que GRK2 está expresada a altos niveles en neuronas y en células de glía, sólo recientemente se ha comenzado a investigar su posible papel

fisiopatológico en enfermedades como el Alzheimer (AD) o el infarto cerebral. La cantidad de GRK2 localizada en la membrana se ha encontrado significativamente reducida en un modelo de ratón transgénico de AD que sobreexpresa el péptido beta-amiloide, a pesar de que los niveles totales de la quinasa se encontraban incrementados (37). Este cambio en los niveles de GRK2 precede a las alteraciones cognitivas y se correlaciona con una hiperactividad de GPCR como los receptores de trombina y glutamato en células de glía. La proteína GRK2 cerebral también modula la inflamación mediada por microglía, y sus niveles de expresión podrían influir en la sensibilidad al infarto cerebral (38). Más recientemente, se ha encontrado una correlación positiva entre los niveles de GRK2 en linfocitos periféricos y la severidad de la enfermedad en pacientes de AD (39). Sin embargo, queda por determinar si esta expresión en linfocitos refleja cambios en la expresión de GRK2 en el cerebro y si estos cambios son específicos de AD frente a otras enfermedades degenerativas como el Parkinson.

## **PAPEL FUNCIONAL DE GRK2 EN MIGRACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES E INMUNES. IMPLICACIONES FISIOPATOLÓGICAS**

La migración celular requiere la integración espacio-temporal de información procedente de señales mecánicas y de moléculas difusibles actuando a través de GPCRs como quimioquinas, lípidos bioactivos como la esfingosina-1 fosfato (S1P) y de factores de crecimiento. Las alteraciones en procesos migratorios están presentes en enfermedades inflamatorias crónicas, invasión tumoral y metástasis, y otras patologías (40). En este sentido, además de participar en la regulación y señalización de diversos GPCR relacionados con procesos migratorios, se ha mostrado que GRK2 puede interactuar con diferentes proteínas implicadas en migración, como MEK, Akt, ezrina, PI3K y GIT (4, 7, 9, 41). Datos recientes sugieren que GRK2 desempeña un papel complejo y muy relevante en migración de células epiteliales e inmunes. El efecto global de los niveles de GRK2 en el proceso migratorio parece depender del tipo celular, de los estímulos específicos actuando a través de receptores GPCR, RTK o de integrinas, así como del contexto de señalización, e implicar su interacción dinámica con varias proteínas celulares.

### **GRK2 y enfermedades inflamatorias**

GRK2, altamente expresada en diferentes tipos celulares del sistema inmune, parece constituir un importante regulador de las respuestas de estas células

en situaciones de inflamación. GRK2 fosforila muchos receptores de quimioquinas como CCR5, CCR2b, CXCR4, CXCR2 y receptores quimiotácticos para la sustancia P, S1P, o fMLP, responsables del tráfico de leucocitos hacia los focos inflamatorios, de la salida de células T desde los órganos linfoides, o de la activación y proliferación de leucocitos (27, 41). Es de destacar que se ha encontrado una disminución de la expresión de GRK2 (del orden del 50%) en leucocitos de pacientes con artritis reumatoide o de esclerosis múltiple, en comparación con sujetos sanos (revisado en referencias 27 y 41). El hecho de que esta disminución de niveles es consecuencia directa de la patología se ha demostrado en modelos animales de artritis, que específicamente muestra una reducción de la expresión de GRK2 en esplenocitos y en células de los nodos linfáticos mesentéricos. De acuerdo con su papel en desensibilización de GPCRs, se ha mostrado que GRK2 atenúa la migración inducida por quimioquinas de células T y de monocitos, de tal forma que al decrecer los niveles de GRK2 se produce una migración incrementada (4, 27, 42).

La disminución de los niveles de GRK2 en células inmunes durante la inflamación podría representar inicialmente un mecanismo adaptativo para facilitar la respuesta celular; sin embargo un déficit crónico de GRK2 promovería una respuesta inflamatoria exagerada o aberrante. Así, células T aisladas de ratones hemicigotos para GRK2 (que presentan una reducción del 50% en los niveles de esta quinasas) muestran un aumento significativo en la señalización y en la quimiotaxis promovida por ligandos de receptores CCR1 y CCR5 en comparación con células de ratones salvajes (43). Sin embargo, no se ha comprobado que la alteración en los niveles de GRK2 sea determinante para la progresión de la artritis reumatoide. Esta noción si parece abrirse paso en otra enfermedad inflamatoria como la esclerosis múltiple (44). La expresión de GRK2 en leucocitos de pacientes de esta patología (y no de otros desórdenes neurológicos sin un componente inflamatorio) se encuentra disminuida del orden del 40% en relación con individuos sanos. Es interesante destacar que el inicio de la encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE) está significativamente acelerada en ratones hemicigotos para GRK2, que muestran una mayor infiltración inicial de células T en el cerebro. Curiosamente, estos animales muestran menores infiltrados inflamatorios a largo plazo y menos recaídas de la enfermedad comparado con animales control. Por tanto, los efectos de una expresión de GRK2 alterada no tiene una correlación evidente en términos patológicos, ya que muchos tipos celulares, no solamente del sistema inmune sino también del tejido inflamado, son responsables del desarrollo de la patología y pueden responder de forma diferente a esos cambios. Se necesitan, por tanto, más datos sobre los mecanismos de regulación de GRK2 y su efecto en distin-

tos tipos celulares para evaluar la posible eficacia terapéutica de la modulación de los niveles de GRK2 en artritis reumatoide y otras patologías inflamatorias.

Otra relación funcional de GRK2 recientemente descrita puede ser también relevante en patologías cardiovasculares e inflamatorias. Nuestro grupo ha mostrado que GRK2 fosforila directamente a p38 MAPK en el residuo T123, que está localizado a la entrada del canal de anclaje («docking groove»), que p38 utiliza para interaccionar específicamente con sus quinasas activadoras y con sus sustratos. Hemos demostrado que la fosforilación en ese residuo interfiere con la capacidad de p38 de ser activada y también con su asociación a sustratos (45). Más aún, cambios en los niveles de GRK2 pueden modificar procesos celulares mediados por p38, tales como la diferenciación a adipocitos y la secreción de TNF $\alpha$  tras la estimulación con LPS, que está incrementada en macrófagos procedentes de ratones heterocigotos para GRK2 (45). Es interesante destacar que la actividad y los niveles de GRK2 parecen correlacionar inversamente con el estado de activación de p38 en diferentes situaciones patológicas, tales como hipertensión y fallo cardíaco (3), y procesos inflamatorios como la artritis reumatoide o enfermedades inflamatorias intestinales, lo que de nuevo sugiere un papel importante de GRK2 en el control de la activación de p38 (46).

## GRK2 y cáncer

Los GPCRs están implicados en muchos aspectos de la progresión del cáncer y la metástasis. Los receptores de S1P, LPA, diversos receptores de quimioquinas y receptores activados por proteasas (PARs) se encuentran sobreexpresados en diferentes tumores, lo que conduce a una proliferación y migración celular alteradas. En este contexto, GRK2 podría contribuir a estos procesos como un modulador negativo clásico de estos GPCRs.

Sin embargo, sorprendentemente, GRK2 también parece poder actuar como un transductor positivo de la señal de alguno de estos receptores. Por ejemplo, nuestro laboratorio y otros grupos han encontrado que GRK2 potencia la señalización a través del receptor Smoothed y coopera con éste en transformación de líneas celulares de fibroblastos y en ensayos de formación de focos (48, 49). Además, otras funciones de GRK2 independientes de GPCRs parecen estar implicadas en posibles actividades pro-transformantes de esta quinasa. GRK2 atenua los efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos de TGF- $\beta$  en células de hepatocarcinoma humano (13). Por otra parte, diferentes vías de señalización relacionadas con cáncer pueden causar un incremento en los niveles de GRK2 en diversas líneas celulares de cáncer de mama (11, 25).



En este sentido, hemos demostrado recientemente que GRK2 se degrada rápidamente por el proteasoma, y que Mdm2, una E3-ubiquitina ligasa implicada en el control del crecimiento celular y la apoptosis, y bien conocida por su papel en controlar la degradación y actividad transcripcional de p53, desempeña un papel crítico en la ubiquitinación y recambio de GRK2 en respuesta a la activación de GPCRs (25). Este proceso implica la función adaptadora de beta-arrestina. Por el contrario, la activación de la vía de señalización PI3K/Akt por agonistas como IGF-1 altera el patrón de fosforilación de Mdm2 y promueve su localización nuclear, lo que impide la degradación de GRK2 y promueve un incremento de los niveles de esta quinasa (25). Este descubrimiento predice que la disfunción de la vía de señalización PI3K/Akt que tiene lugar en muchos tipos de cáncer, provocará una alteración de los niveles de GRK2 en distintos tipos celulares.

En este sentido, hemos descubierto recientemente (17) que los niveles incrementados de GRK2 potencian la migración de células epiteliales hacia fibronectina, mientras que la disminución de los niveles de la quinasa promueve el efecto contrario. El efecto de GRK2 en la migración celular a fibronectina implica la activación paracrina de receptores de S1P acoplados a Gi. GRK2 modula positivamente la actividad de la vía de señalización Rac/PAK/MEK/ERK en respuesta a adhesión y a S1P por un mecanismo que implica su interacción dinámica (dependiente de fosforilación) con GIT1, una proteína adaptadora clave en procesos de migración celular (16, 17).

Estos nuevos datos apuntan la idea de que los niveles de expresión de GRK2 pueden alterar la migración celular en condiciones patológicas. La migración alterada de células epiteliales es crítica en la progresión de cáncer y en procesos metastáticos en respuesta a señales que incluyen integrinas y GPCRs (S1P, quimiocinas, PARs) (47, 50). Nuestros datos preliminares muestran que la migración de células transformadas de cáncer de mama también se regula positivamente al aumentar los niveles de GRK2 y se inhibe fuertemente cuando se silencia la expresión de GRK2 utilizando la metodología de siRNA (Salcedo, Mayor y Penela en preparación), lo que sugiere que GRK2 podría ser una potencial diana terapéutica en cáncer. En la actualidad, estamos investigando si GRK2 puede contribuir también a otros aspectos de la progresión del cáncer, como proliferación o diferenciación. Por otra parte, será también necesario profundizar en el análisis de posibles cambios de expresión de GRK2 en pacientes de cáncer. Se han descrito incrementos en los niveles de GRK2 en muestras de pacientes con tumores de tiroides (28) y de cáncer de mama (nuestros propios datos), mientras que se han observado disminuciones en un subgrupo de tumores de próstata (51). Será interesante determinar en el futuro las causas de estas alteraciones en los niveles de GRK2 y su posible implicación en el proceso de transformación oncogénica.



## GRK2 COMO DIANA TERAPÉUTICA

Como en el caso de otras proteínas quinasas, la búsqueda de inhibidores ATP-miméticos de GRK2 plantea el problema de la especificidad y los efectos secundarios. Dado que el dominio catalítico de las GRKs está altamente conservado, será difícil encontrar inhibidores específicos de isoforma. Además, los nuevos datos sobre dominios específicos de interacción de GRK2 con otras proteínas celulares pueden abrir nuevas estrategias de modulación basadas en el diseño de péptidos o moléculas capaces de alterar específicamente esas interacciones. Por último, una mejor comprensión de los mecanismos moleculares que regulan la expresión y función de GRK2 podrían ser también utilizados para modular indirectamente su actividad *in vivo* mediante agentes capaces de modular su expresión o estabilidad de forma específica de tipo celular.

En resumen, el complejo interactoma de GRK2, que implica a múltiples proteínas señalizadoras implicadas en procesos biológicos esenciales, sugieren nuevos papeles funcionales de GRK2 relevantes en fisiología y patología humanas. Sin embargo, la modulación de esa red de interacciones por señales extracelulares, su papel fisiológico o patológico concreto, y su integración espacial y temporal con otras funciones de GRK2, están aún por determinar.

## AGRADECIMIENTOS

La labor de mi grupo de investigación es posible gracias a proyectos y ayudas del Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2005-03053), Fundación Ramón Areces, Fundación Mutua Madrileña, la Red de investigación cooperativa en enfermedades cardiovasculares (RECAVA) del Instituto de Salud Carlos III (RD06-0014/0037), la red de excelencia INSINET de la Comunidad de Madrid (S-SAL-0159-2006), y la Red de excelencia europea MAIN (Migration and Inflammation) (LSHG-CT-2003-502935).

## LISTA DE ABREVIATURAS

βAR, receptor beta-adrenérgico; EGF, factor de crecimiento epidérmico; GPCR, receptores acoplados a proteínas G; GRK, quinasa de receptores acoplados a proteínas G; MAPK, quinasa activada por mitógenos; S1P, esfingosina-1-fosfato.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Jacoby E, Bouhelal R, Gerspacher M, y Seuwen K (2006) The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem*. **1** 761-82.
2. Penela P, Ribas C, y Mayor F, Jr. (2003) Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal*. **15** 973-81.
3. Penela P, Murga C, Ribas C, Tutor AS, Peregrin S, y Mayor F, Jr. (2006) Mechanisms of regulation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*. **69** 46-56.
4. Ribas C, Penela P, Murga C, Salcedo A, Garcia-Hoz C, Jurado-Pueyo M, Aymenrich I, y Mayor F, Jr. (2007) The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochim Biophys Acta*. **1768** 913-22.
5. Lodowski DT, Pitcher JA, Capel WD, Lefkowitz RJ, y Tesmer JJ (2003) Keeping G proteins at bay: a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and Gbetagamma. *Science*. **300** 1256-62.
6. Moore CA, Milano SK, y Benovic JL (2007) Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol*. **69** 451-82.
7. Premont RT y Gainetdinov RR (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol*. **69** 511-34.
8. DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, y Shenoy SK (2007) Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol*. **69** 483-510.
9. Reiter E y Lefkowitz RJ (2006) GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab*. **17** 159-65.
10. Hupfeld CJ y Olefsky JM (2007) Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by GRKs and beta-arrestins. *Annu Rev Physiol*. **69** 561-77.
11. Hildreth KL, Wu JH, Barak LS, Exum ST, Kim LK, Peppel K, y Freedman NJ (2004) Phosphorylation of the platelet-derived growth factor receptor-beta by G protein-coupled receptor kinase-2 reduces receptor signaling and interaction with the Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor. *J Biol Chem*. **279** 41775-82.
12. Chen Y, Long H, Wu Z, Jiang X, y Ma L (2008) EGF Transregulates Opioid Receptors through EGFR-mediated GRK2 Phosphorylation and Activation. *Mol Biol Cell*. **19** 2973-83.
13. Ho J, Cocolakis E, Dumas VM, Posner BI, Laporte SA, y Lebrun JJ (2005) The G protein-coupled receptor kinase-2 is a TGFbeta-inducible antagonist of TGFbeta signal transduction. *Embo J*. **24** 3247-58.

14. Naga Prasad SV, Laporte SA, Chamberlain D, Caron MG, Barak L, y Rockman HA (2002) Phosphoinositide 3-kinase regulates beta2-adrenergic receptor endocytosis by AP-2 recruitment to the receptor/beta-arrestin complex. *J Cell Biol.* **158** 563-75.
15. Jimenez-Sainz MC, Murga C, Kavelaars A, Jurado-Pueyo M, Krakstad BF, Heijnen CJ, Mayor F, Jr., y Aragay AM (2006) G Protein-coupled Receptor Kinase 2 Negatively Regulates Chemokine Signaling at a Level Downstream from G Protein Subunits. *Mol Biol Cell.* **17** 25-31.
16. Hoefen RJ y Berk BC (2006) The multifunctional GIT family of proteins. *J Cell Sci.* **119** 1469-75.
17. Penela P, Ribas C, Aymerich I, Eijkelkamp N, Barreiro O, Heijnen CJ, Kavelaars A, Sanchez-Madrid F, y Mayor F, Jr. (2008) G protein-coupled receptor kinase 2 positively regulates epithelial cell migration. *Embo J.* **27** 1206-18.
18. Elorza A, Sarnago S, y Mayor F, Jr. (2000) Agonist-dependent modulation of G protein-coupled receptor kinase 2 by mitogen-activated protein kinases. *Mol Pharmacol.* **57** 778-83.
19. Sarnago S, Elorza A, y Mayor F, Jr. (1999) Agonist-dependent phosphorylation of the G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) by Src tyrosine kinase. *J Biol Chem.* **274** 34411-6.
20. Garcia-Higuera I y Mayor F, Jr. (1994) Rapid desensitization of neonatal rat liver beta-adrenergic receptors. A role for beta-adrenergic receptor kinase. *J Clin Invest.* **93** 937-43.
21. Ruiz-Gomez A y Mayor F, Jr. (1997) Beta-adrenergic receptor kinase (GRK2) co-localizes with beta-adrenergic receptors during agonist-induced receptor internalization. *J Biol Chem.* **272** 9601-4.
22. Ramos-Ruiz R, Penela P, Penn RB, y Mayor F, Jr. (2000) Analysis of the human G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) gene promoter: regulation by signal transduction systems in aortic smooth muscle cells. *Circulation.* **101** 2083-9.
23. Penela P, Elorza A, Sarnago S, y Mayor F, Jr. (2001) Beta-arrestin- and c-Src-dependent degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *Embo J.* **20** 5129-38.
24. Elorza A, Penela P, Sarnago S, y Mayor F, Jr. (2003) MAPK-dependent degradation of G protein-coupled receptor kinase 2. *J Biol Chem.* **278** 29164-73.
25. Salcedo A, Mayor F, Jr., y Penela P (2006) Mdm2 is involved in the ubiquitination and degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2. *Embo J.* **25** 4752-62.
26. Jaber M, Koch WJ, Rockman H, Smith B, Bond RA, Sulik KK, Ross J, Jr., Lefkowitz RJ, Caron MG, y Giros B (1996) Essential role of beta-adrenergic receptor kinase 1 in cardiac development and function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93** 12974-9.

27. Vroon A, Heijnen CJ, y Kavelaars A (2006) GRKs and arrestins: regulators of migration and inflammation. *J Leukoc Biol.* **80** 1214-21.
28. Metaye T, Gibelin H, Perdriest R, y Kraimps JL (2005) Pathophysiological roles of G-protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal.* **17** 917-28.
29. Theilade J, Strom C, Christiansen T, Haunso S, y Sheikh SP (2003) Differential G protein receptor kinase 2 expression in compensated hypertrophy and heart failure after myocardial infarction in the rat. *Basic Res Cardiol.* **98** 97-103.
30. Rockman HA, Chien KR, Choi DJ, Iaccarino G, Hunter JJ, Ross J, Jr., Lefkowitz RJ, y Koch WJ (1998) Expression of a beta-adrenergic receptor kinase 1 inhibitor prevents the development of myocardial failure in gene-targeted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95** 7000-5.
31. Lymperopoulos A, Rengo G, Funakoshi H, Eckhart AD, y Koch WJ (2007) Adrenal GRK2 upregulation mediates sympathetic overdrive in heart failure. *Nat Med.* **13** 315-23.
32. Gros R, Benovic JL, Tan CM, y Feldman RD (1997) G-protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension. *J Clin Invest.* **99** 2087-93.
33. Harris DM, Cohn HI, Pesant S, y Eckhart AD (2008) GPCR signalling in hypertension: role of GRKs. *Clin Sci (Lond).* **115** 79-89.
34. Eckhart AD, Ozaki T, Tevaearai H, Rockman HA, y Koch WJ (2002) Vascular-targeted overexpression of G protein-coupled receptor kinase-2 in transgenic mice attenuates beta-adrenergic receptor signaling and increases resting blood pressure. *Mol Pharmacol.* **61** 749-58.
35. Liu S, Premont RT, Kontos CD, Zhu S, y Rockey DC (2005) A crucial role for GRK2 in regulation of endothelial cell nitric oxide synthase function in portal hypertension. *Nat Med.* **11** 952-8.
36. Dinudom A, Fotia AB, Lefkowitz RJ, Young JA, Kumar S, y Cook DI (2004) The kinase Grk2 regulates Nedd4/Nedd4-2-dependent control of epithelial Na<sup>+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101** 11886-90.
37. Suo Z, Wu M, Citron BA, Wong GT, y Festoff BW (2004) Abnormality of G-protein-coupled receptor kinases at prodromal and early stages of Alzheimer's disease: an association with early beta-amyloid accumulation. *J Neurosci.* **24** 3444-52.
38. Lombardi MS, van den Tweel E, Kavelaars A, Groenendaal F, van Bel F, y Heijnen CJ (2004) Hypoxia/ischemia modulates G protein-coupled receptor kinase 2 and beta-arrestin-1 levels in the neonatal rat brain. *Stroke.* **35** 981-6.
39. Leosco D, Fortunato F, Rengo G, Iaccarino G, Sanzari E, Golino L, Zincarelli C, Canonico V, Marchese M, Koch WJ, y Rengo F (2007) Lymphocyte G-protein-

- coupled receptor kinase-2 is upregulated in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. **415** 279-82.
40. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, y Horwitz AR (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. **302** 1704-9.
  41. Penela P, Murga C, Ribas C, Salcedo A, Jurado-Pueyo M, Rivas V, Aymerich I, y Mayor F, Jr. (2008) G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) in migration and inflammation. *Arch Physiol Biochem*. **114** 195-200.
  42. DeFea KA (2007) Stop that cell! Beta-arrestin-dependent chemotaxis: a tale of localized actin assembly and receptor desensitization. *Annu Rev Physiol*. **69** 535-60.
  43. Vroon A, Heijnen CJ, Lombardi MS, Cobelens PM, Mayor F, Jr., Caron MG, y Kavelaars A (2004) Reduced GRK2 level in T cells potentiates chemotaxis and signaling in response to CCL4. *J Leukoc Biol*. **75** 901-9.
  44. Vroon A, Kavelaars A, Limmroth V, Lombardi MS, Goebel MU, Van Dam AM, Caron MG, Schedlowski M, y Heijnen CJ (2005) G protein-coupled receptor kinase 2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. **174** 4400-6.
  45. Peregrin S, Jurado-Pueyo M, Campos PM, Sanz-Moreno V, Ruiz-Gomez A, Crespo P, Mayor F, Jr., y Murga C (2006) Phosphorylation of p38 by GRK2 at the docking groove unveils a novel mechanism for inactivating p38MAPK. *Curr Biol*. **16** 2042-7.
  46. Mayor F, Jr., Jurado-Pueyo M, Campos PM, y Murga C (2007) Interfering with MAP kinase docking interactions: implications and perspective for the p38 route. *Cell Cycle*. **6** 528-33.
  47. Dorsam RT y Gutkind JS (2007) G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*. **7** 79-94.
  48. Meloni AR, Fralish GB, Kelly P, Salahpour A, Chen JK, Wechsler-Reya RJ, Lefkowitz RJ, y Caron MG (2006) Smoothed signal transduction is promoted by G protein-coupled receptor kinase 2. *Mol Cell Biol*. **26** 7550-60.
  49. Molnar C, Holguin H, Mayor F, Jr., Ruiz-Gomez A, y de Celis JF (2007) The G protein-coupled receptor regulatory kinase GPRK2 participates in Hedgehog signaling in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104** 7963-8.
  50. Milstien S y Spiegel S (2006) Targeting sphingosine-1-phosphate: a novel avenue for cancer therapeutics. *Cancer Cell*. **9** 148-50.
  51. Prowatke I, Devens F, Benner A, Grone EF, Mertens D, Grone HJ, Lichter P, y Joos S (2007) Expression analysis of imbalanced genes in prostate carcinoma using tissue microarrays. *Br J Cancer*. **96** 82-8.